

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

L37 ANSWER 1 OF 2 ZCAPLUS COPYRIGHT 2002 ACS

AN 1997:614432 ZCAPLUS

DN 127:230346

TI **Capillary electrophoresis apparatus**

IN Akashi, Mitsuru; Kishida, Akio; Baba, Yoshinobu; Ito, Kenichi; Kimura, Shio; Inami, Yasuhiko

PA Akashi Mitsuru, Japan; Toyobo Co., Ltd.; Kyowa Medex Co., Ltd.; Nippon Oil and Fats Co., Ltd.

SO Jpn. Kokai Tokkyo Koho, 6 pp.

CODEN: JKXXAF

DT Patent

LA Japanese

FAN.CNT 1

PATENT NO.	KIND	DATE	APPLICATION NO.	DATE
------------	------	------	-----------------	------

PI JP 09236580	A2	19970909	JP 1996-43050	19960229
----------------	----	----------	---------------	----------

AB The invention relates to a **capillary electrophoresis** medium for sepn. and anal. of optical isomers, plasmas, proteins, amino acids, sugars, or nucleic acids, wherein a is added to the medium to suppress adsorption of the sample species.

IT 28408-65-3, N-Vinylacetamide polymer
(**capillary electrophoresis** medium contg. polyvinylamines)

RN 28408-65-3 ZCAPLUS

CN Acetamide, N-ethenyl-, homopolymer (9CI) (CA INDEX NAME)

CM 1

CRN 5202-78-8

CMF C4 H7 N O

AcNH-CH=CH₂

ATTORNEY DOCKET NUMBER: 9584-039-999
SERIAL NUMBER: 10/629,524
REFERENCE: B10

MEDIUM FOR CAPILLARY ELECTROPHORESIS

Patent Number: JP9236580
Publication date: 1997-09-09
Inventor(s): AKASHI MITSURU;; KISHIDA AKIO;; BABA YOSHINOBU;; ITO KENICHI;; KIMURA SHIHO;; INAMI YASUHIKO
Applicant(s): AKASHI MITSURU;; TOYOBO CO LTD;; KYOWA MEDEX CO LTD;; NOF CORP
Requested Patent: ☐ JP9236580
Application Number: JP19960043050 19960229
Priority Number (s):
IPC Classification: G01N27/447; B01D57/02
EC Classification:
Equivalents:

Abstract

PROBLEM TO BE SOLVED: To enhance the separability, reproducibility and reliability while suppressing the adsorption of a sample easily adsorbed on a capillary by adding polyvinylamine to a medium for capillary electrophoresis.

SOLUTION: A medium for capillary electrophoresis contains polyvinylamine. Polyvinylamine is a polymer containing a polymerization unit (polymerization unit A) represented by formula I obtained by polymerizing vinylamine and may be a polymer also having a polymerization unit (polymerization unit B) represented by formula II. Concretely, a polymer obtained by partially or wholly hydrolyzing poly(N-vinylalkylamide) is designated. In the formula II, R is an alkyl group such as a methyl group, an ethyl group, an isopropyl group or a t-butyl group. The number of the polymerization units A in polyvinylamine is pref. 10-10000 and the number of the polymerization unit B is pref. 0-10000.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-236580

(43) 公開日 平成9年(1997)9月9日

(51) Int. Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 27/447			G 0 1 N 27/26	3 3 1 E
B 0 1 D 57/02			B 0 1 D 57/02	

審査請求 未請求 請求項の数 1 O L (全 6 頁)

(21) 出願番号 特願平8-43050

(22) 出願日 平成8年(1996)2月29日

特許法第30条第1項適用申請有り 平成7年9月1日
社団法人高分子学会発行の「高分子学会予集第44巻11
号」に発表

(71) 出願人 000244143

明石 満

鹿児島県鹿児島市皇徳寺台2丁目14-6

(71) 出願人 000003160

東洋紡績株式会社

大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番8号

(71) 出願人 000162478

協和メデックス株式会社

東京都中央区入船二丁目1番1号

(71) 出願人 000004341

日本油脂株式会社

東京都渋谷区恵比寿四丁目20番3号

(74) 代理人 弁理士 酒井 一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 キャピラリー電気泳動用媒体

(57) 【要約】

【課題】 キャピラリーに吸着しやすい試料の吸着を抑え、分離能、再現性、信頼性を向上させるための、キャピラリー電気泳動用媒体を提供する。

【解決手段】 ポリビニルアミンを含むことを特徴とするキャピラリー電気泳動用媒体。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ポリビニルアミンを含むことを特徴とするキャピラリー電気泳動用媒体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、キャピラリー電気泳動法にて光学異性体、血清、タンパク質、アミノ酸、糖、核酸等の分離・分析を行う際のキャピラリー内充填液及び試料の調製液として用いるキャピラリー電気泳動用媒体に関する。

【0002】

【従来の技術】キャピラリー電気泳動法は、電気泳動を直径200 μ m以下の溶解シリカキャピラリー内等のマイクロ領域で行うために、従来から広く用いられてきたスラブ電気泳動法等に比べ、ジュール熱、拡散及び対流の発生が非常に小さい。したがって短時間で高分解能の分離を行うことができ、さらに必要とされる試料も数百nI以下と極少量であるため、光学異性体、血清、タンパク質、アミノ酸、糖、核酸等の新しい分離・分析技術として注目されている。

【0003】また、これらの測定対象物を的確に分離するために、キャピラリー内部に、メチルセルローズ (M. Strege and A. Lagu, Anal. Chem., 63,1233(1991))、ヒドロキシプロピルメチルセルローズ (H. E. Schwartz et al., J. Chromatogr., 559,267(1991))、アガロース (P. Bocek and A. Chrambach, Electrophoresis, 12,1059(1991))等の水溶性高分子や界面活性剤等を添加した緩衝液を用いることや、ポリアクリルアミド等のハイドロゲルを充填したキャピラリー (A. S. Cohen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85,9660(1988))を用いることが広く行われている。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】しかしタンパク質の分離・分析においては、キャピラリーの素材がシリカであるためキャピラリーの内壁に試料が吸着しやすく、分離能、再現性が悪く信頼性に劣るという問題点がある。そこで、キャピラリーの内壁をシランカップリングーポリアクリルアミドでコーティングしタンパク質等の吸着を抑制する技術が提案されている。しかしこの方法では、コーティング操作が煩雑であり、またシャープなピークを得るのに十分均一なコーティングを得ることが困難であるという問題がある。

【0005】従って、本発明の目的は、キャピラリーに吸着しやすい試料の吸着を抑え、分離能、再現性、信頼性を向上させるための、キャピラリー電気泳動用媒体を提供することにある。

【0006】

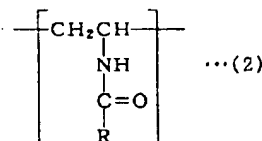
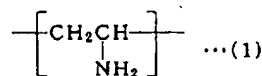
【課題を解決するための手段】本発明によれば、ポリビニルアミンを含むことを特徴とするキャピラリー電気泳動用媒体が提供される。

【0007】

【発明の実施の形態】本発明のキャピラリー電気泳動用媒体は、ポリビニルアミンを含む。本発明でいうポリビニルアミンとは、ビニルアミンが重合した下記一般式(1)で表される重合単位(以下重合単位Aと略す)を含む重合体であり、下記一般式(2)で表される重合単位(以下重合単位Bと略す)をも有する重合体であってもよい。具体的にはポリ(N-ビニルアルキルアミド)の一部分又は全てを加水分解して得られる重合体を挙げることができる。

【0008】

【化1】



【0009】Rはメチル基、エチル基、イソプロピル基、又はtert-ブチル基等のアルキル基を表す。ポリビニルアミン中の重合単位Aの数は、10~10000が好ましく、重合単位Bの数は0~10000が好ましい。

【0010】重合単位Bを有する場合の重合単位Bの数：重合単位Aの数は1：0.0001~1：10.000、好ましくは1：0.1~1：100、さらに好ましくは1：1~1：100である。

【0011】前記ポリビニルアミンの分子量は、500~1,000,000、好ましくは、1,000~500,000、特に好ましくは10000~100000が望ましい。

【0012】ポリビニルアミンは、例えば、まずN-ビニルアセチルアミド、N-ビニルイソプロピルアミド等のN-ビニルアルキルアミド類をラジカル重合、イオン重合、光重合、放射線重合等の方法により重合して、ポリ(N-ビニルアルキルアミド)を得、さらにこれらを加水分解すること等により、容易に得ることができる。

【0013】前記ラジカル重合は、水あるいはメタノール、エタノール等のアルコール類、クロロホルム、塩化メチレン、テトラヒドロフラン、1,4-ジオキサン、N,N-ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、アセトニトリル等の有機溶媒あるいは水とこれらの有機溶媒との混合溶媒中で、脱気条件下、あるいは窒素、アルゴン、二酸化炭素等の不活性ガス雰囲気下で、ラジカル重合開始剤の存在下、-50~200℃、好ましくは、0~120℃で、10分間~200時間、好ましくは、1~24時間反応させることによって行なうことができる。

【0014】ラジカル重合開始剤としては、10時間半

減期温度が160℃以下のアゾ系化合物及び/又は有機過酸化物を用いるのが好ましい。具体的には、アゾ系化合物としては、2-シアノ-2-プロピルアゾホルムアミド、1, 1'-アゾビス(シクロヘキサン-1-カルボニトリル)、2, 2'-アゾビス(2-アミノプロパン)二塩酸塩、2, 2'-アゾビス(2-メチルブチロニトリル)、2, 2'-アゾビスイソブチロニトリル、2, 2'-アゾビス(2, 4-ジメチルバレロニトリル)、2, 2'-アゾビス(4-メトキシ-2, 4-ジメチルバレロニトリル)、4, 4'-アゾビス(4-シアノ吉草酸)、2, 2'-アゾビスイソ酪酸ジメチル、2, 2'-アゾビス(2-(5-メチル-2-イミダゾリン-2-イル)プロパン)二塩酸塩、2, 2'-アゾビス(2-(2-イミダゾリン-2-イル)プロパン)二塩酸塩、2, 2'-アゾビス(2-(2-イミダゾリン-2-イル)プロパン)、2, 2'-アゾビス(2-メチル-N-(1, 1-ビス(ヒドロキシメチル)エチル)プロピオンアミド)、2, 2'-アゾビス(2-メチル-N-(2-ヒドロキシエチル)プロピオンアミド)、2, 2'-アゾビスブチリルアミド二水和物、2, 2'-アゾビス(2-(ヒドロキシメチル)プロピオニトリル)、2, 2'-アゾビス(2, 4, 4-トリメチルペンタン)等が挙げられる。有機過酸化物としては、過酸化ベンゾイル、ジイソプロピルオキシジカーボネート、ターシャリブチルペルオキシ-2-エチルヘキサノエート、ターシャリブチルペルオキシヒパレート、ターシャリブチルペルオキシジイソブチレート、過酸化ラウロイル、 α -ブチルペルオキシアセテート、ターシャリブチルペルオキソクトエイト、ターシャリブチルペルオキシベンゾエイト等を挙げることができる。これらは混合物として用いることもできる。前記ラジカル重合開始剤の使用量は、原料の重合性単量体100重量部に対し10重量部以下が好ましく、特に5重量部以下が望ましい。

【0015】前記ポリ(N-ビニルアルキルアミド)の加水分解は、触媒として塩酸、硫酸、トリル酸、陽イオン交換樹脂等の酸触媒；アンモニア、トリエチルアミン、水酸化ナトリウム、炭酸ナトリウム、炭酸水素ナトリウム、陰イオン交換樹脂等の塩基触媒等を用いて、水；メタノール、エタノール、プロパノール、ブタノール等のアルコール類；アセトニトリル、テトラヒドロフラン、1, 4-ジオキサン等の有機溶媒あるいはこれらの混合溶媒中で、0~120℃、好ましくは20~100℃で、1分間~200時間、好ましくは10分間~24時間反応させることにより行うことができる。また、触媒にヒドラジンを用いて、50~100℃、1~48時間攪拌してもよい。また、 $(C_2H_5)_3O^+BF_4^-$ をクロロホルム、塩化メチレン、ベンゼン等の有機溶媒中、0~60℃で、30分間~6時間ポリ(N-ビニルアルキルアミド)に作用させ、さらに炭酸水素ナトリウム等

の弱塩基を作用させることによっても行うことができる。

【0016】本発明のキャピラリー電気泳動用媒体中のポリビニルアミンの含有量は、その分子量や加水分解率により様々であり特に限定されないが、一般的には0.0001~10mg/ml、好ましくは0.001~0.1mg/mlであることが望ましい。この範囲内で添加量を変化させることにより所望の電気浸透流を得ることができる。

【0017】本発明のキャピラリー電気泳動用媒体に含まれるポリビニルアミン以外の成分としては、本発明の効果を損なわない限り、キャピラリー電気泳動用媒体に適用しうる各種緩衝液等を制限なく使用できる。一般的には、pH1~12、好ましくは3~10のリン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、クエン酸緩衝液、酢酸緩衝液、炭酸緩衝液、トリス緩衝液等のpH緩衝液を併せて用いることができる。また、デキストラン、ヒアルロン酸、ヒドロキシメチルセルロース等の多糖類、ポリビニルアルコール、ポリエチレングリコール、ポリビニルピロリドン等の合成高分子類等を含有してもよい。

【0018】本発明のキャピラリー電気泳動用媒体を充填するキャピラリーとしては、キャピラリー電気泳動用あるいはガスクロマトグラフィー用に市販されているものを制限なく使用できる。前記キャピラリーの寸法としては、内径が通常1~200 μ m、好ましくは50~100 μ m、長さが通常1cm~10m、好ましくは10cm~1mのものを好ましく使用することができる。長さが1cm未満の場合、十分な分離が行えず、また10mを超える場合、分離に長時間が必要となるため好ましくない。

【0019】本発明のキャピラリー電気泳動用媒体の使用方法としては、キャピラリー内及び電極槽及び試料槽を該媒体で満たした後、従来から知られている操作・条件によって電気泳動を行うことができる。

【0020】前記電気泳動の際の電圧は、1~30kV、好ましくは5~20kVであることが望ましい。試料の注入方法としては、重力法、泳動法等従来から知られている方法で行うことができる。また電気泳動の際の温度は、特に管理する必要はないが、より高い再現性を得るために恒温条件を保つことが好ましく、さらに分離能の向上及び測定時間の短縮のために泳動中に昇温あるいは降温してもよい。

【0021】本発明のキャピラリー電気泳動用媒体を用いて泳動することができる物質としては、水溶性あるいは水分散性の物質であり、特に限定されないが、中でも、優れた効果が発揮される物質としては、水性環境下においてpKaの高い化合物、あるいはpI値の高いタンパク質等が挙げられる。これらpKa又はpIの高い物質は、従来の技術では、キャピラリー内壁が負に帯電しているため吸着されやすく、測定結果における再現性

・信頼性が低下してしまっていた。

【0022】

【発明の効果】本発明のキャピラリー電気泳動用媒体は、ポリビニルアミンを含むので、キャピラリーに吸着しやすく従来キャピラリー電気泳動による分離が困難であった試料についても、キャピラリー内壁への吸着を抑制し、優れた再現性を与える。また、ポリビニルアミンが被検試料と電気的相互作用、疎水的相互作用、水素結合あるいは分子ふり効果等の種々の相互作用を発現することにより、優れた分離能をも与えることができる。従って、信頼性の高い電気泳動を行うことができる。

【0023】

【実施例】以下実施例によりさらに詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【0024】

【合成例1-1~1-4】N-ビニルアセチルアミド（以下NVAと略す）5g（58.8mmol）を蒸留水45mlに溶解し、これに表1に示す量のVA-044（商品名、和光純薬工業（株）製、2,2'-アゾビス（2-（2-イミダゾリン-2-イル）プロパン））を加え、脱気封管した後、60℃で24時間重合させた。反応終了後、メタノール中に再沈殿しポリNVAを得た。GPC（展開溶媒：THF、標準サンプル：ポリメチルメタクリレート）を用いて分子量を求めた。結果を表1に示す。

【0025】

【表1】

N-ビニルアセチルアミドの重合結果

合成例	NVA/VA-044(モル比)	分子量
1-1	50	11,800
1-2	200	47,200
1-3	800	83,300
1-4	1000	100,000

【0026】

【合成例2-1~2-4】合成例1-4で得られたポリNVA（分子量100,000）3gを2N-HCl水溶液100mlに溶解し、加熱還流下、加水分解処理を行った。表2に示す所定時間毎に20mlをサンプリングし、限外濾過の後、凍結乾燥し粉末状の試料を得た。得られた試料の加水分解率を¹H-NMRより求めた。結果を表2に示す。

【0027】

【表2】

合成例1-4で得られたポリNVAの
加水分解処理時間と加水分解率

合成例	加水分解処理時間(時間)	加水分解率(%)
1-4	0	0.0
2-1	2	20.8
2-2	5	45.5
2-3	10	66.0
2-4	40	100.0

【0028】

【合成例3-1~3-3】合成例1-1~1-3で得られたポリNVA1gをそれぞれ2N-HCl水溶液30mlに溶解し、40時間還流した。限外濾過の後、凍結乾燥し粉末状のポリビニルアミンを得た。

【0029】

【実施例1】合成例2-4で得られたポリビニルアミン（分子量約50,100）を20mMの酢酸緩衝液（pH3.7）に0.01mg/mlとなるよう溶解し、キャピラリー電気泳動用媒体とした。この媒体を用い下記の条件でキャピラリー電気泳動を行った。得られた結果を図1に示す。なお、試料注入は、25mVで3秒間行った。

【0030】検体試料：リボヌクレアーゼ、ミオグロビン、チトクロームC、リゾチームの混合物

泳動条件：

装置：日本分光（株）製 CE-900

キャピラリー内径：100μm

キャピラリー外径：375μm

キャピラリー長：65cm

有効キャピラリー長：50cm

印加電圧：26kV（400V/cm）

温度：30±0.5℃

検出器：UV（200nm）

【0031】

【比較例1】20mMの酢酸緩衝液（pH3.7）のみを用い、実施例1と同様の条件でキャピラリー電気泳動を行った。得られた結果を図1に併記する。

【0032】

【比較例2】実施例1と同様に、ただし合成例1-4で得られたポリNVAを用いてキャピラリー電気泳動を行った。得られた結果を図1に併記する。

【0033】以上の結果（図1）より、

1. 従来の緩衝液のみでは検体（蛋白質）がキャピラリー内壁に吸着してしまい、ピークは検出されなかった。（比較例1）。

2. ポリNVAを用いた場合、検体の吸着は抑制されるものの検体の分離は不十分であった。

3. 一方、本発明のポリビニルアミンを添加した系では、検体の吸着が抑制されると同時に、高い分離能も得られた。ことが明らかである。

【0034】

【参考例1】合成例1-4及び2-1~2-4で得られたポリNVA又はポリビニルアミンを、それぞれ酢酸緩衝液(20mM, pH3.7)に0.1mg/mlとなるよう溶解し、測定マーカーに1%フェノール溶液を用いて電気浸透流を測定した。結果を図2に示す。なお、試料注入は、10kVで3秒間行った。図2に示されるようにポリNVAの加水分解率を変化させることで所望の電気浸透流が得られることが明らかである。

【0035】

【参考例2】合成例3-1~3-3及び2-4で得られたポリビニルアミンを酢酸緩衝液(20mM, pH3.7)に、図中に示す種々の濃度で溶解したものを用い、測定マーカーに1%フェノール溶液を用いて電気浸透流を測定した。結果を図3に示す。図3に示されるようにポリNVAの濃度及び分子量を変化させることで所望の電気浸透流が得られることが明らかである。

【0036】

【参考例3】pH3.7及びpH8.6の緩衝液に、合

成例2-3で得られたポリビニルアミンを図中に示す種々の濃度で溶解したものについて、電気浸透流を測定した。結果を図4に示す。濃度が増加するにつれ電気浸透流は減少し、pH3.7~8.6の広い範囲で電気浸透流を逆転させることができた。図4の結果から、濃度を変化させることで所望の電気浸透流が得られることが明らかである。

【0037】参考例1~3の結果から、本発明のキャピラリー電気泳動用媒体を用いると、電気浸透流を所望の値とすることができることが分かる。

【図面の簡単な説明】

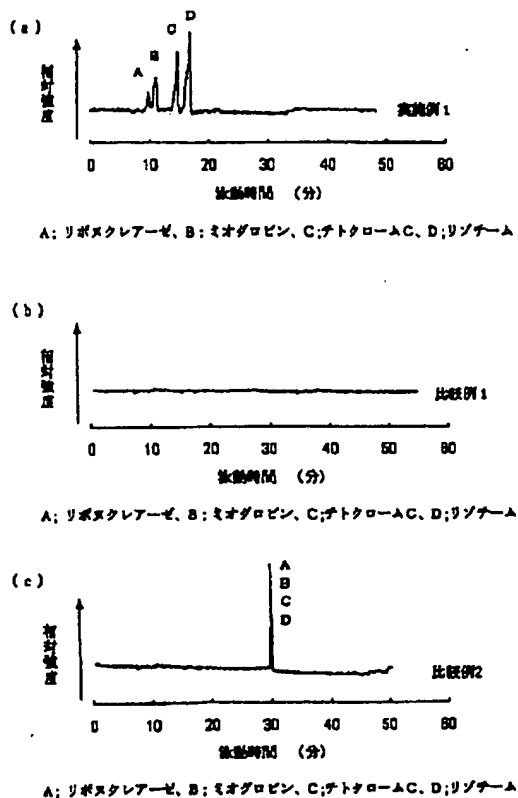
【図1】図1(a)、図1(b)及び図1(c)は、それぞれ実施例1、比較例1及び比較例2でのキャピラリー電気泳動チャートを示す図である。

【図2】図2は、参考例1の結果を示す図である。

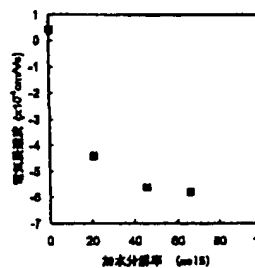
【図3】図3は、参考例2の結果を示す図である。

【図4】図4は、参考例3の結果を示す図である。

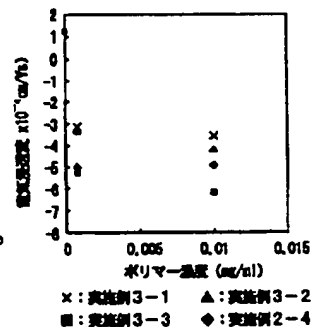
【図1】



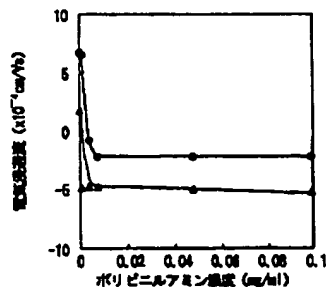
【図2】



【図3】



【図4】



フロントページの続き

(72)発明者 明石 清
鹿児島県鹿児島市皇徳寺台2-14-6
(72)発明者 岸田 晶夫
鹿児島県鹿児島市皇徳寺台3-8-2
(72)発明者 馬場 嘉信
兵庫県神戸市垂水区多聞1-1-18-402

(72)発明者 伊藤 健一
鹿児島県鹿児島市荒田2-45-16-301
(72)発明者 木村 志緒
鹿児島県鹿児島市唐湊3-3-1
(72)発明者 稲見 康彦
宮崎県宮崎市清武町大字船引631-1

*** NOTICES ***

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.**** shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1] The medium for capillary-tube electrophoresis characterized by including a polyvinyl amine.

[Translation done.]

* NOTICES *

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[The technical field to which invention belongs] this invention relates to the medium for capillary-tube electrophoresis used as the sealing liquid in a capillary tube at the time of performing separation and analysis of an optical isomer, a blood serum, protein, amino acid, sugar, a nucleic acid, etc. in a capillary-tube electrophoresis method, and manufacture liquid of a sample.

[0002]

[Description of the Prior Art] A capillary-tube electrophoresis method is compared with the slab electrophoresis method widely used from the former in order to perform electrophoresis in the micro fields in a fused-silica ***** rally with a diameter of 200 micrometers or less etc., and occurrence of the Joule's heat, a diffusion, and the convection current is very the parvus. Therefore, a high resolution is separable for a short time, and with several 100 or less nls, since the sample needed further is also very little, it attracts attention as new separation / analysis techniques, such as an optical isomer, a blood serum, protein, amino acid, sugar, and a nucleic acid.

[0003] In order to separate these measuring object objects exactly, moreover, inside a capillary tube A methyl cellulose (M.Strege and A.Lagu, Anal.Chem., 63, 1233 (1991)), The hydroxypropyl methylcellulose (H.E.Schwartz et al., J.Chromatogr., and 559,267 (1991)), The buffer solution which added water soluble polymers, surfactants, etc., such as agarose (P.Bocek and A.Chrambach, Electrophoresis, 12, 1059 (1991)), is used. Using the capillary tube (A.S.Cohen et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 85, 9660 (1988)) filled up with hydro gels, such as a polyacrylamide, is performed widely.

[0004]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] However, in a separation and analysis of protein, since the material of a capillary tube is a silica, a sample tends to stick to the wall of a capillary tube, and there is a trouble where a separability and repeatability are bad inferior to a reliability. Then, the technique which coats the wall of a capillary tube with a silane-coupling-polyacrylamide and suppresses proteinic adsorption is proposed. However, by this technique, the problem that it is difficult to obtain sufficiently uniform coating is for coating operation to acquire a complicated and sharp peak.

[0005] Therefore, the purpose of this invention suppresses the adsorption of a sample which is easy to stick to a capillary tube, and is to offer the medium for capillary-tube electrophoresis for raising a separability, repeatability, and a reliability.

[0006]

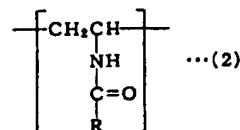
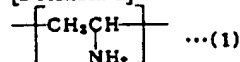
[Means for Solving the Problem] According to this invention, the medium for capillary-tube electrophoresis characterized by including a polyvinyl amine is offered.

[0007]

[Embodiments of the Invention] The medium for capillary-tube electrophoresis of this invention contains a polyvinyl amine. A vinyl amine may be a polymer containing the polymerization unit (it abbreviates to polymerization unit A below) expressed with the following general formula (1) which carried out the polymerization, and the polyvinyl amine said by this invention may be a polymer which also has the polymerization unit (it abbreviates to polymerization unit B below) expressed with the following general formula (2). The polymer which specifically understands the part or all of poly (N-vinyl alkylamide) an added water part, and is obtained can be mentioned.

[0008]

[Formula 1]



[0009] R expresses alkyl groups, such as a methyl group, an ethyl group, an isopropyl machine, or t-butyl. As for the number of polymerization unit A in a polyvinyl amine, 10-10000 are desirable, and, as for the number of polymerization unit B, 0-10000 are desirable.

[0010] the number of number: polymerization unit A of polymerization unit B in the case of having polymerization unit B --

1:0.0001 to 1:10,000 -- desirable -- 1:0.1-1:100 -- it is 1:1-1:100 still preferably

[0011] the molecular weight of the aforementioned polyvinyl amine -- 500-1,000,000 -- desirable -- 1,000-500,000 -- 10000-100000 are especially preferably desirable

[0012] for example, a polyvinyl amine can carry out the polymerization of the N-vinyl alkylamide, such as N-vinyl acetyl amide and N-vinyl isopropyl amide, by technique, such as a radical polymerization, ionic polymerization, photopolymerization, and radiation polymerization, first, can obtain poly (N-vinyl alkylamide), and can obtain it easily by understanding these an added water part further etc.

[0013] The aforementioned radical polymerization Alcohols, such as water or a methanol, and ethanol, In organic solvents, such as chloroform, a methylene chloride, a tetrahydrofuran, 1, 4-dioxane, N,N-dimethylformamide, dimethyl sulfoxide, and an acetonitrile, or the mixed solvent of water and these organic solvents Under a deaeration condition or the inert gas ambient atmosphere, such as nitrogen, an argon, and a carbon dioxide, under presence of a radical polymerization initiator, preferably, it is 0-120 degrees C, and -50-200 degrees C can be performed by making it react for 1 to 24 hours for for 10 minutes to 200 hours.

[0014] As a radical polymerization initiator, it is desirable that half-life temperature uses an azo system compound and/or organic peroxide 160 degrees C or less for 10 hours. As an azo system compound, specifically A 2-cyano-2-propyl azo formamide, - azobis (cyclohexane-1-carbonitrile), and 1 and 1 '2, 2'-azobis (2-amidino propane) 2 hydrochloride, A - azobis (2-methyl butyronitrile), and 2 and 2 '2, 2'-azobisisobutyronitril, - azobis (2,4-dimethylvaleronitrile), and 2 and 2 '2, 2'-azobis (4-methoxy-2,4-dimethylvaleronitrile), A - azobis (4-cyano valeric acid), and 4 and 4 '2, 2'-azobisiso butyric-acid dimethyl, 2 and 2'-azobis (2-(5-methyl-2-imidazoline-2-****) propane) 2 hydrochloride, 2 and 2'-azobis (2-(2-imidazoline-2-****) propane) 2 hydrochloride, 2 and 2'-azobis (2-(2-imidazoline-2-****) propane), 2 and 2'-azobis (2-methyl-N-(1 and 1-screw (hydroxymethyl) ethyl) propione amide), 2 and 2'-azobis (2-methyl-N-(2-hydroxyethyl) propione amide), - azobis (2-(hydroxymethyl) propionitrile), and 2 and 2'-azobis butyryl amide dihydrate, 2, and 2 '2, 2'-azobis (2, 4, and 4-trimethyl pentane) etc. is mentioned. As organic peroxide, a benzoyl peroxide, ***** row yloxy dicarbonate, tertiarybutyl peroxy-2-ethylhexanoate, the tertiarybutyl peroxy pivalate, tertiarybutyl peroxy ***** butyrate, a lauroyl peroxide, t-butylperoxy acetate, tertiary peroxy octoate, tertiarybutyl peroxy benzoate, etc. can be mentioned. These can also be used as mixture. Below 10 weight section of the amount of the aforementioned radical polymerization initiator used is desirable to the polymerization nature monomer 100 weight section of a raw material, and below its 5 weight section is especially desirable.

[0015] The aforementioned hydrolysis of poly (N-vinyl alkylamide) As a catalyst, acid-catalyst; ammonia, such as a hydrochloric acid, a sulfuric acid, a tosyl acid, and a cation exchange resin, A triethylamine, a sodium hydroxide, a sodium carbonate, a sodium hydrogencarbonate, Base catalysts, such as an anion exchange resin, etc. are used. A water; methanol, ethanol, In organic solvents, such as alcohols; acetonitriles [, such as propanol and a butanol,], tetrahydrofuran, 1, and 4-dioxane, or these mixed solvents It is 20-100 degrees C preferably, and 0-120 degrees C can be performed for for 1 minute to 200 hours by making it react preferably for for 10 minutes to 24 hours. Moreover, a hydrazine may be used for a catalyst and 50-100 degrees C may be agitated for 1 to 48 hours. Moreover, it can carry out also by making 3(C₂H₅) O+BF₄- act on poly (N-vinyl alkylamide) at 0-60 degrees C among organic solvents, such as chloroform, a methylene chloride, and benzene, for 30 minutes - for 6 hours, and making weak bases, such as a sodium hydrogencarbonate, act further.

[0016] Although the content of the polyvinyl amine in the medium for capillary-tube electrophoresis of this invention is especially various and is limited by neither the molecular weight nor the adding-water cracking severity, generally it is desirable that 0.0001-10mg /is [ml] 0.001-0.1mg/ml preferably. A desired electroendosome style can be obtained by changing an addition within the limits of this.

[0017] As components other than the polyvinyl amine contained in the medium for capillary-tube electrophoresis of this invention, unless the effect of this invention is spoiled, it can be used without a limit of the various buffer solutions which can be applied to the medium for capillary-tube electrophoresis. general -- pH 1-12 -- pH buffer solutions, such as the phosphate buffer solution of 3-10, the boric-acid buffer solution, the citric-acid buffer solution, the acetic-acid buffer solution, the carbonic acid buffer solution, and a tris buffers, can be used collectively preferably Moreover, you may contain synthetic macromolecules, such as polysaccharide, such as a dextran, a hyaluronic acid, and a hydroxymethyl cellulose, polyvinyl alcohol, a polyethylene glycol, and a polyvinyl pyrrolidone.

[0018] It can be used that there is no limit of what is marketed the object for capillary-tube electrophoresis or for gas chromatographies as a capillary tube filled up with the medium for capillary-tube electrophoresis of this invention. As a dimension of the aforementioned capillary tube, a bore can use 50-100 micrometers and a length can usually use preferably 1-200 micrometers of 10cm - 1m things 1cm - 10m. When sufficient separation cannot be performed when a length is less than 1cm, and exceeding 10m, since a long time is needed for a separation, it is not desirable.

[0019] As operation of the medium for capillary-tube electrophoresis of this invention, after filling the inside of a capillary tube, an electrode tub, and a sample tub with this medium, the operation and the conditions known from the former can perform electrophoresis.

[0020] As for the voltage in the case of the aforementioned electrophoresis, it is preferably desirable that it is 5-20kV 1-30kV. As the injection technique of a sample, it can carry out by the technique learned from the former, such as a gravity method and the migrating method. although it is not necessary to manage especially the temperature in the case of electrophoresis, in order moreover,] to obtain higher repeatability -- constant temperature -- maintaining conditions -- desirable -- further -- while migrating for the enhancement in a separability, and compaction of the measuring time -- a temperature up -- or you may lower the temperature

[0021] Although it is the matter of water solubility or water dispersibility and it is not especially limited as matter which can migrate using the medium for capillary-tube electrophoresis of this invention, as matter with which the outstanding effect is demonstrated, the high compound of pKa or the protein with high pI value is listed to the bottom of an aqueous environment especially. By the prior art, since the capillary-tube wall was charged in negative, it was easy to adsorb, and as for these [pKa] or the high matter of pI, the repeatability and the reliability in a measurement result had fallen.

[0022]

[Effect of the Invention] Since the medium for capillary-tube electrophoresis of this invention contains a polyvinyl amine, that it is easy to stick to a capillary tube, conventionally, also about the difficult sample, the separation by capillary-tube electrophoresis suppresses the adsorption to a capillary-tube wall, and gives the outstanding repeatability. Moreover, the outstanding separability can also be given when a polyvinyl amine discovers various interactions, such as a specimen, an electric interaction, a hydrophobic interaction, hydrogen bond, or the molecular sieve effect. Therefore, reliable electrophoresis can be performed.

[0023]

[Example] Although an example explains still in detail below, this invention is not limited to these.

[0024]

[The synthetic example 1-1 to 1-4] N-vinyl acetyl amide (it abbreviates to NVA below) 5g (58.8mmol) is melted in 45ml of distilled water, and after adding and carrying out the deaeration sealed tube of VA-044 (tradename, product [made from Wako Pure Medicine Industry], 2, and 2'-azobis (2-(2-imidazoline-2-****) propane)) of the amount shown in Table 1 to this, the polymerization was carried out at 60 degrees C for 24 hours. It reprecipitated after a reaction end and in the methanol, and Pori NVA was obtained. Molecular weight was calculated using GPC (expansion solvent; THF, correlation sample; polymethylmethacrylate). A result is shown in Table 1.

[0025]

[Table 1]

N-ビニルアセチルアミドの重合結果

合成例	NVA/VA-044(モル比)	分子量
1-1	50	11,800
1-2	200	47,200
1-3	800	83,300
1-4	1000	100,000

[0026]

[The synthetic example 2-1 to 2-4] Poly-NVA(molecular weight 100,000)3g obtained in the synthetic example 1-4 was melted in 100ml of the 2N-HCl aqueous solutions, and hydrolysis processing was performed under heating reflux. 20ml was sampled for every predetermined time shown in Table 2, after the ultrafiltration, it freeze-dried and the powdered sample was obtained. It asked for the adding-water cracking severity of the obtained sample from 1H-NMR. A result is shown in Table 2.

[0027]

[Table 2]

合成例1-4で得られたポリNVAの

加水分解処理時間と加水分解率

合成例	加水分解処理時間(時間)	加水分解率(%)
1-4	0	0.0
2-1	2	20.8
2-2	5	45.5
2-3	10	66.0
2-4	40	100.0

[0028]

[The synthetic example 3-1 to 3-3] Poly-NVA1g obtained in the synthetic example 1-1 to 1-3 was melted in 30ml of the 2N-HCl aqueous solutions, respectively, and it flowed back for 40 hours. After the ultrafiltration, it freeze-dried and the powdered polyvinyl amine was obtained.

[0029]

[Example 1] The polyvinyl amine (molecular weight 50,100 [about]) obtained in the synthetic example 2-4 was melted in the acetic-acid buffer solution (pH3.7) of 20mMs so that it might be set to ml in 0.01mg /, and it considered as the medium for capillary-tube electrophoresis. Capillary-tube electrophoresis was performed on condition that the following using this medium. The obtained result is shown in drawing 1. In addition, sample injection was performed for 3 seconds by 25mV.

[0030] An analyte sample; RNase, a myoglobin, cytochrome C, mixture migration conditions of a lysozyme; product made from equipment; Day Duty Light CE-900 capillary-tube bore;100micrometer capillary-tube outer-diameter;375micrometer capillary-tube length; -- effective 65cm -- capillary-tube length;50cm applied-voltage;26kV (400v/(cm))

Temperature;30*0.5 degree-C detector;UV (200nm)

[0031]

[The example 1 of a comparison] Capillary-tube electrophoresis was performed on the same conditions as an example 1 only using the acetic-acid buffer solution (pH3.7) of 20mMs. The obtained result is written together to drawing 1.

[0032]

[The example 2 of a comparison] Capillary-tube electrophoresis was performed like the example 1 using Pori NVA obtained in the synthetic example 1-4. The obtained result is written together to drawing 1.

[0033] From the above result (drawing 1), only with the buffer solution of 1. former, an analyte (protein) sticks to a capillary-tube wall, and the peak was not detected. (Example 1 of a comparison).

2. The separation of an analyte was inadequate although adsorption of an analyte was suppressed when poly-NVA was used.

3. On the other hand, by the system which added the polyvinyl amine of this invention, while adsorption of an analyte was suppressed, the high separability was also obtained. Things are clear.

[0034]

[The example 1 of reference] poly-[which was obtained by the synthetic example 1-4 and 2-1 to 2-4] -- NVA or the polyvinyl amine was melted in the acetic-acid buffer solution (20mM, pH 3.7), respectively, so that it might be set to ml in 0.1mg / , the phenol solution was used for the measurement marker 1%, and the electroendosmose style was measured A result is shown in drawing 2. In addition, sample injection was performed for 3 seconds by 10kV. it is shown in drawing 2 -- as -- poly-- it is clear that a desired electroendosmose style is obtained by changing the adding-water cracking severity of NVA

[0035]

[The example 2 of reference] Using what was melted by the various concentration which shows the polyvinyl amine obtained by the synthetic example 3-1 to 3-3, and 2-4 to the acetic-acid buffer solution (20mM, pH 3.7) all over drawing, the phenol solution was used for the measurement marker 1%, and the electroendosmose style was measured. A result is shown in drawing 3. It is clear that a desired electroendosmose style is obtained by changing the concentration and molecular weight of Pori NVA as shown in drawing 3.

[0036]

[The example 3 of reference] The electroendosmose style was measured about what was melted by the various concentration which shows the polyvinyl amine obtained in the synthetic example 2-3 to the buffer solution of pH 3.7 and pH 8.6 all over drawing. A result is shown in drawing 4. The electroendosmose style was able to decrease and was able to reverse the electroendosmose style in [large] pH 3.7-8.6 as concentration increased. It is clear that a desired electroendosmose style is obtained from the result of drawing 4 by changing concentration.

[0037] The result of the examples 1-3 of reference shows that it can consider as the value of a request of an electroendosmose style, when the medium for capillary-tube electrophoresis of this invention is used.

[Translation done.]